



# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 22 AOUT 2003

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M+Leuc', is written over a horizontal line.

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

Cette demande est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

bis, rue de Saint Pétersbourg  
5800 Paris Cedex 08  
téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Reserve INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **09. AVR. 1999**  
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **99 04443**  
DEPARTEMENT DE DÉPÔT **75**  
DATE DE DÉPÔT **09 AVR. 1999**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

**AVENTIS PHARMA S.A.**  
Direction Brevets  
20 avenue Raymond Aron  
92165 ANTONY CEDEX

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

demande divisionnaire



☐ demande initiale

☐ certificat d'utilité

transformation d'une demande  
de brevet européen

☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent références du correspondant

numéro de téléphone

**7485(7.12.98)**

**ST 99010**

**01 55 71 71 14**

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ diffère

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☒ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

**COMPOSITION DESTINÉE A LA CONSERVATION D'ADENOVIRUS RECOMBINANTS INFECTIEUX**

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN **3 04 4 6 3 2 8 4**

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

**AVENTIS PHARMA S.A.**

Forme juridique

Nationalité (s)

**Française**

Adresse (s) complète (s)

**20 avenue Raymond Aron  
92160 ANTONY**

Pays

**FRANCE**

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

**LOBJOIS Françoise**

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

*[Signature]*



# BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

## DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

### DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : (1) 42 94 52 52 - Télécopie : (1) 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99 0 4 4 4 3

ST 99010

### TITRE DE L'INVENTION :

COMPOSITION DESTINEE A LA CONSERVATION D'ADENOVIRUS  
RECOMBINANTS INFECTIEUX

### LE (S) SOUSSIGNÉ (S)

RHONE-POULENC RORER S.A.  
20 avenue Raymond Aron  
92160 ANTONY

### DÉSIGNE (NT) EN TANT QU'INVENTEUR (S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

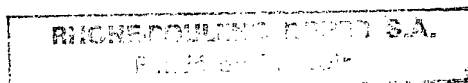
BLANCHE Francis - 41 rue des Solitaires, 75019 PARIS

SHIH Shian-Jiun - 1048 Flying Fish Street, FOSTER CITY, CA 94404

**NOTA** : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Antony, le 9 avril 1999



LOBJOIS Françoise

# DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
15			X	13.03.00	15 MAI 2001 / N B
	16				

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

COMPOSITION DESTINEE A LA CONSERVATION D'ADENOVIRUS  
RECOMBINANTS INFECTIEUX

La présente invention concerne la conservation d'adénovirus sous une forme stabilisée et stockable et les compositions liquides ou congelées destinées à cette  
5 conservation.

La conservation d'adénovirus dans des compositions stables est un problème connu, qui a fait l'objet de nombreuses études, sans pour autant donner des résultats véritablement satisfaisants jusqu'à présent. Les virus recombinants ne sont en effet utilisables que si l'on parvient à les stocker sans dégradation et sans perte de leur  
10 pouvoir infectieux.

L'état physique des particules adénovirales, en solution, subit deux types d'altérations simultanément et rapidement au cours du temps : d'une part une agrégation (coagulation) des particules sous forme d'amas ou de filaments, qui est un phénomène extrêmement grave car il est irréversible, et d'autre part une désintégration de la  
15 structure icosahédrale des capsides elles-mêmes (par une lyse des capsides et libération des capsomères dans le milieu).

Dans la demande internationale WO 98/02522 a été décrit un procédé de conservation de virus recombinants infectieux sous forme de suspension dans une solution aqueuse comprenant du saccharose. Les compositions préconisées ne contiennent pas de  
20 glycérol et contiennent selon un aspect préféré au moins un sel de cation divalent ou de cation alcalin monovalent.

Cependant il peut être montré que le saccharose n'apporte pas systématiquement une stabilisation à +4°C, et selon les cas la stabilisation à cette température ne dépasse jamais une période de 2 semaines, ou au mieux inférieure à 2 mois.

25 Dans J. Virology, 70(11), 7498-7509 (1996) ont été décrites des conservations d'adénovirus sous forme de solutions tampon à base de tampon Tris et de glycérol, mais contenant systématiquement du chlorure de magnésium. Ces préparations nécessitent une conservation à des températures très basses, de l'ordre de -70°C pour éviter une réduction de leur pouvoir infectieux.

30 Dans Human Gene Therapy, 7, 1693-99 (1996) est également utilisée une formulation de stockage à base de tampon Tris et de glycérol, et comprenant du chlorure de magnésium. Cette formulation est conservée à -80°C.

Plus généralement, les formulations à base de Tris décrites dans la littérature à ce jour contiennent de façon systématique du chlorure de magnésium (1 mM en général) ou/et un sel à concentration physiologique (généralement NaCl à 150 mM). On peut citer par exemple à titre illustratif [Cell, 68, 143-155 (1992) ; Nature Genetics, 3, 229-234 (1993) ; Human Gene Therapy, 6, 5-11 (1995) ; Human Gene Therapy, 6, 145-153 (1995) ; Human Gene Therapy, 6, 277-287 (1995) ; Human Gene Therapy, 6, 643-666 (1995) ; Human Gene Therapy, 6, 1039-1044 (1995) ; Human Gene Therapy, 6, 1317-1322 (1995) ; Human Gene Therapy, 6, 1587-1593 (1995) ; Human Gene Therapy, 7, 2177-2184 (1996) ; J. Virology, 73, 1601-1608 (1999)]. Lorsque les auteurs le précisent, la conservation du virus est effectuée systématiquement à -70°C / -80°C.

Il a été montré depuis, que l'évolution de la structure virale (agrégation et lyse) est un phénomène très dépendant de facteurs tels que la concentration de certains contre-ions cationiques ajoutés à la solution et aussi tels que la concentration d'adénovirus. Au dessus de concentrations de 1E12 pv/ml environ, l'agrégation et la désintégration des capsides (donc la perte de pouvoir infectieux) sont observées en quelques heures à quelques jours, selon les compositions pharmaceutiques utilisées, alors que ces phénomènes deviennent plus lents à faible concentration. De ce fait il est particulièrement difficile de conserver pendant un temps prolongé des compositions fortement concentrées en particules virales.

Il a été ainsi trouvé, et c'est ce qui fait l'objet de la présente invention, que les adénovirus recombinants infectieux pouvaient être conservés en milieu aqueux, à des températures comprises entre +4 et +20°C, sous forme de suspension dans une solution tampon capable de fixer le pH du milieu à des valeurs légèrement alcalines, additionnée de glycérol et sans adjonction de cations métalliques divalents ou de cations alcalins.

Plus spécifiquement le pH du milieu est fixé entre 8,0 et 9,6.

Les compositions liquides ou congelées contenant les particules adénovirales dans une solution tampon additionnée de glycérol entrent dans le cadre de la présente invention. Ces compositions présentent l'avantage considérable d'une bonne stabilité, mais aussi d'être particulièrement adaptées à la conservation pendant un temps prolongé de concentrations élevées en particules virales.

Selon l'invention, la solution tampon capable de fixer le pH du milieu entre 8,0 et 9,6 est constituée soit d'un système acide/base comprenant le Tris [tris(hydroxyméthyl)aminométhane], ou la lysine et un acide choisi parmi un acide fort (acide chlorhydrique par exemple) ou un acide faible (acide maléique, acide malique, ou acide acétique par exemple), soit d'un système acide/base comprenant l'Hepes [acide 2-(4-(2-hydroxyéthyl pipérazin)-1-yl)éthanesulfonique] et une base forte (soude par exemple).

De préférence le pH est fixé entre 8,4 et 8,8 et encore plus particulièrement à 8,4 (valeur mesurée à 25°C).

La concentration de la solution tampon est déterminée de manière à exercer l'effet tampon dans une limite et un volume ou la valeur du pH ne soit pas affectée. La concentration molaire en acide + base peut varier de 10 à 500 mM, de préférence de 20 à 100 mM, et plus particulièrement elle est fixée à 20 mM. Parmi les systèmes tampons selon l'invention, la solution tampon Tris/HCl à une concentration de 20 mM donne des résultats particulièrement satisfaisants.

Selon l'invention, la composition contient 10 à 50 % de glycérol, et de préférence entre 20 et 25 % (volumes à volumes).

Les compositions selon l'invention peuvent en outre contenir optionnellement d'autres adjuvants. Ces derniers peuvent être choisis parmi des polymères (polyéthylène glycols, par exemple PEG 400, PEG 8000), les pluronics (Pluronic F68 par exemple) notamment à raison d'environ 1 à 20 % en poids, les polysorbates (notamment le Tween-20, par exemple à 0,01 à 1 % en poids), ou choisi parmi des sucres comme par exemple le saccharose, le mannitol, ou le dextrose (notamment à raison d'environ 5 à 10 %) ou encore parmi les alcools (notamment l'éthanol) à raison de 1 à 10 % en volume.

Les compositions selon l'invention sont particulièrement adaptées à la conservation des préparations adénovirales de forte concentration. En effet les compositions ainsi stabilisées permettent de maintenir les particules virales en suspension aqueuse liquide (notamment entre +4 et +20°C) tout en préservant le pouvoir infectieux du virus et ceci même à des concentrations virales très élevées (depuis des valeurs de 1E8 pv/ml jusqu'à 1E12 pv/ml ou jusqu'à 1E13 pv/ml et pouvant même aller jusqu'à 5E13 pv/ml).



Selon une autre alternative de l'invention le virus peut aussi être congelé à  $-20^{\circ}\text{C}$ , conservé ainsi plusieurs mois ou plus longtemps, puis décongelé dans cette formulation sans dommage ni pour sa structure ni pour son pouvoir infectieux.

5 Selon l'invention, les compositions peuvent être préparées par mise en suspension dans la solution tampon, de particules adénovirales initialement obtenues en solution aqueuse, puis purifiées, suivie de l'addition de glycérol et éventuellement de l'addition d'un adjuvant tel que cité précédemment.

10 L'adénovirus recombinant infectieux peut être obtenu suivant les méthodes habituelles de production dans des cellules de lignées transcomplémentantes d'encapsidation, par exemple les cellules de la lignée 293 ou de la lignée PER-C6. Les particules virales peuvent être ensuite purifiées par centrifugation en gradient de chlorure de césium comme décrit par exemple dans Journal of General Virology, 34, 19-35 (1977). Plus préférentiellement les particules virales sont purifiées par chromatographie liquide en mode d'échange d'anion, de filtration sur gel, en mode 15 hydrophobe ou par chélation de métal. La purification par échange d'anion est particulièrement avantageuse puisqu'elle permet d'obtenir en une seule étape de chromatographie une préparation virale pure, débarrassée des protéines, des acides nucléiques, et autres impuretés et métabolites provenant de la cellule productrice, et débarrassée des composés apportés par le milieu de culture. Des modes préférés de 20 purification par chromatographie sont décrits dans la demande internationale WO 98/00524 ou comme ci-après dans les exemples. Les particules adénovirales sont ensuite formulées dans le tampon de conservation sélectionné en utilisant notamment des méthodes de dialyse, de diafiltration, ou de chromatographie de filtration sur gel. La composition ainsi obtenue peut être éventuellement congelée et conservée à une 25 température de stockage souhaitée (par exemple  $-20^{\circ}\text{C}$ ), mais cette opération n'est cependant pas indispensable à la conservation sur une longue durée, les compositions étant stables à l'état liquide entre  $+4$  et  $+20^{\circ}\text{C}$ .

30 Les compositions selon l'invention sont stables, sans dégradation notable [stabilité physique et biologique (pouvoir infectieux)] pendant une durée d'au moins 6 mois à  $+4^{\circ}\text{C}$  ou d'au moins 5 mois à  $+20^{\circ}\text{C}$ . On entend plus particulièrement par solution stable physiquement, une solution ne présentant pas d'apparition de coagulation, de sédimentation de particules ou de précipité (par estimation visuelle, par mesure de la densité optique, par l'analyse en microscopie électronique, ou par l'analyse de distribution de taille des particules) après la période de conservation considérée.

La présente invention concerne plus particulièrement la conservation d'adénovirus infectieux sous une forme stabilisée et les compositions liquides ou congelées destinées à cette conservation.

5 La formulation selon l'invention présente l'intérêt d'être la première composition réalisée permettant la conservation des adénovirus sous forme liquide à des températures de +4 à +20°C tout en ayant la possibilité d'avoir une concentration virale élevée. L'invention est particulièrement intéressante dans son application aux adénovirus recombinants, mais elle peut être appliquée d'une manière générale à tous les adénovirus (sauvages ou recombinants).

10 A titre d'exemple peuvent être cités notamment les adénovirus ci-après qui peuvent être avantageusement conservés dans une composition selon l'invention : l'ensemble des adénovirus sauvages humains, appartenant aux six sous-groupes connus dénommés A, B, C, D, E, et F, et plus particulièrement l'ensemble des 49 sérotypes différents d'adénovirus humains composant ces six sous-groupes. De même,  
15 l'invention pourra s'appliquer aux virus sauvages simiens, bovins, équins, porcins, ovins, ou canins appartenant à la famille des *Adenoviridae*. De plus, l'invention pourra s'appliquer aux virus mutants provenant des virus sauvages appartenant à la famille des *Adenoviridae*.

Parmi les vecteurs adénovirus recombinants auxquels la présente invention peut  
20 s'appliquer, on peut citer tous les adénovirus modifiés comportant une ou plusieurs délétion dans la région du génome appelée E1, ou dans la région E2, ou dans la région E3 ou dans la région E4, ainsi que les virus recombinants comportant plusieurs délétions combinées dans les régions ci-dessus, ainsi qu'aux virus recombinants complètement délétés (appelés gutless) [FASEB, 11, 615 (1997)].

25 De même, la présente invention s'applique aussi aux vecteurs adénoviraux recombinants comportant en outre un acide nucléique d'intérêt. L'acide nucléique d'intérêt peut être inséré en différents sites du génome de l'adénovirus. Avantagusement, il est inséré au niveau de la région E1, E3, ou E4. Cependant, il est clair que d'autres sites peuvent être utilisés. En particulier, l'accès à la séquence  
30 nucléotidique du génome permet à l'homme du métier d'identifier des régions permettant d'insérer l'acide nucléique d'intérêt. L'acide nucléique d'intérêt peut être toute séquence d'ADN introduite, en particulier toute séquence dont le transfert et/ou l'expression dans la cellule cible est recherchée.

En particulier, il peut comporter un ou plusieurs gènes thérapeutiques et/ou un ou plusieurs gènes codant pour des protéines antigéniques. Les gènes thérapeutiques qui peuvent ainsi être transférés sont tous les gènes dont la transcription et éventuellement la traduction dans la cellule cible génèrent des produits ayant un effet thérapeutique.

- 5 Parmi les produits thérapeutiques, on peut citer plus particulièrement les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc (WO93/19191), les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques : BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, etc., les apolipoprotéines : ApoA1, ApoIV, ApoE, etc.
- 10 (WO94/25073), la dystrophine ou une minidystrophine (WO93/06223), les gènes permettant de contrôler la resténose : GAX, NOS, etc., les gènes suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc (WO94/24297), les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation : Facteurs VII, VIII, IX, les gènes suicides : TK, etc., les immunoglobulines naturelles ou artificielles : Fab, ScFv (WO94/29446),
- 15 les gènes anti-apoptotiques : AKT, etc.

- Le gène thérapeutique peut également être un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent par exemple être transcrites, dans la cellule cible, en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et
- 20 bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans la demande de brevet EP 140 308.

- De même, la présente invention s'applique aux vecteurs adénoviraux recombinants permettant la production de rétrovirus [Tumor Targeting, 3, 59 (1998)], aux adénovirus comportant une ou plusieurs modifications dans une ou plusieurs
- 25 protéines constitutives de la capsid virale, en particulier la fibre (protéine IV) et la protéine hexon (protéine II), ou aux adénovirus dépourvus de fibre [Journal of Virology, 73, 1601 (1999)], chacune de ces modifications ayant été introduite dans le but de modifier le tropisme naturel de l'adénovirus [Current Opinion in Biotechnology, 8, 583 (1997)].

- 30 Par ailleurs, les compositions selon l'invention sont particulièrement intéressantes du fait qu'elles peuvent être utilisées pour la préparation d'un médicament destiné à un traitement thérapeutique ou prophylactique par thérapie génique.

Les virus infectieux ont de nombreuses applications parmi lesquelles on peut citer leur utilisation dans le domaine de la vaccination et dans le domaine de la thérapie génique. Dans ces applications, après transfert de leur matériel génétique (ARN ou ADN) dans la cellule hôte, les virus utilisent la machinerie cellulaire de la cellule infectée pour réaliser la synthèse de protéines codées par leur propre génome, et induire ainsi l'effet biologique spécifique recherché. Dans des applications de thérapie génique, des virus recombinants infectieux portant un gène d'intérêt thérapeutique sont utilisés pour transférer ce gène dans des cellules spécifiques de l'organe du patient à traiter. Une grande variété de protocoles thérapeutiques ont été décrits et sont actuellement en cours d'évaluation clinique pour transférer et exprimer des gènes thérapeutiques à l'aide de vecteurs viraux. Parmi ces vecteurs, les vecteurs adénoviraux non réplcatifs ont été largement développés durant ces dernières années pour le transfert de gènes codant pour des protéines thérapeutiques. Parmi ces gènes, on peut citer le gène suppresseur de tumeur p53, qui est impliqué dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Divers protocoles d'essais cliniques de transfert du gène p53 à l'aide d'adénovirus chez l'homme sont actuellement développés dans des indications anticancéreuses. Parmi les autres applications en développement, on peut citer le cas du traitement de la mucoviscidose.

L'utilisation de vecteurs adénoviraux comme agents thérapeutiques n'est envisageable que si l'on dispose de méthodes permettant de conserver et stocker les préparations durant des périodes suffisantes longues sans perte significative du pouvoir infectieux des virus en question. C'est pourquoi la présente invention est particulièrement intéressante.

Les exemples suivants donnés à titre non limitatif, montrent comment l'invention peut être mise en pratique, ainsi que la stabilité des compositions et le pouvoir infectieux des particules ainsi formulées.

### **Exemple 1**

#### **Préparation d'une composition selon l'invention :**

Une suspension virale est préparée de la manière suivante : les cellules 293 sont cultivées dans un CellCube (Costar) dans un milieu DMEM supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal. Lorsqu'elles atteignent la confluence, les cellules sont infectées à une multiplicité d'infection de 2 avec une aliquote de la banque de travail de l'adénovirus exprimant le gène p53. Cinq jours après l'infection, le surnageant de

production est récolté par drainage et clarifié par passage à travers un train de filtres de porosité décroissante 10/1/0,8-0,2  $\mu\text{m}$ . Ce surnageant est ensuite concentré 20 fois en volume par ultrafiltration tangentielle sur une membrane Millipore ayant un seuil de coupure de 300 kDa. Le virus est ensuite purifié par chromatographie sur une  
 5 colonne de Source 15Q équilibrée et éluée avec un gradient de chlorure de sodium dans du tampon 20 mM Tris/HCl, pH 8,0. Le pic de virus est collecté, et le virus est concentré par ultrafiltration tangentielle sur une membrane Millipore ayant un seuil de coupure de 300 kDa. Les préparations virales ainsi obtenues sont de très grande pureté et contiennent < 50 ng d'albumine bovine sérique et < 10 ng d'ADN de la cellule hôte  
 10 pour 1E12 particules virales. Le virus est ensuite formulé dans les divers tampons sélectionnés. Pour effectuer cette opération, le changement de tampon est effectué par chromatographie sur colonne PD-10 (Amersham-Pharmacia Biotech) remplie de Sephadex G-25 équilibrée et éluée avec le tampon sélectionné en suivant les instructions du fournisseur. Après dosage par chromatographie, la concentration du  
 15 virus est ajustée si nécessaire à la valeur cible par dilution dans le tampon de formulation sélectionné. La stabilité virale dans les diverses formulations est ensuite étudiée en plaçant pour chacune des formulations sélectionnées, 2 ml de suspension virale dans un tube en polypropylène à la température étudiée (-20°C, +4°C, ou +20°C). Les échantillons sont ensuite conservés à cette température durant une  
 20 période déterminée pour chacune des expériences en question (voir exemples ci-après).

Les analyses par microscopie électronique sont effectuées par dépôt de la solution à analyser sur une grille carbonée qui est ensuite traitée en coloration négative par l'acétate d'uranyle à 1,5 %. L'appareil utilisé pour ces analyse est un microscope  
 25 électronique Jeol 1010 opérant à une tension de 50 kV à 100 kV.

Les analyses de distribution de taille des particules virales sont effectuées par spectroscopie de corrélation de photons (PCS) à l'aide d'un appareil Coulter N4+ (Coultronics).

Les analyses CLHP (chromatographie liquide hautes performances) permettant de  
 30 quantifier les particules virales sont effectuées comme décrit ci-après :

Une colonne de chromatographie remplie avec environ 1 ml de Q Sepharose® XL (45-165  $\mu\text{m}$ ; Amersham-Pharmacia Biotech) est préparée dans une colonne de type HR 5/5 (Amersham-Pharmacia Biotech). Cette colonne, montée sur un système CLHP équipé d'un système de détection UV/visible opérant dans la plage d'absorbance 200-

300 nm, est utilisée pour la séparation et la quantification des particules virales. Avant chaque analyse, la colonne est équilibrée à 30°C dans un tampon 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 à un débit de 1,5 ml/min. L'échantillon à analyser contenant les particules virales est injecté sur la colonne. Après l'injection, la colonne est lavée avec 5 volumes du même tampon, et les espèces fixées sont éluées avec un gradient linéaire de 0 à 1 M de chlorure de sodium dans le tampon 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 sur 30 volumes de colonne. En fin de gradient, la colonne est lavée avec 2 volumes de colonne de soude 0,5 N avant ré-équilibration en vue de l'analyse suivante.

Une courbe étalon à 260 nm est construite avec une préparation de particules d'adénovirus purifiée par chromatographie. Cette préparation étalon a été titrée au préalable en particules par son absorbance à 260 nm dans une solution de SDS à 0,1% en utilisant le facteur de conversion de  $1 \times 10^{10}$  particules par unité d'absorbance à 260 nm). Les échantillons sont filtrés au travers d'un filtre (0,22 µm) avant l'analyse par chromatographie.

15

La technique de titration des adénovirus est décrite par F. L. Graham et al., Molecular Biotechnology, 3, 207 (1995). La technique de mesure de l'expression de la protéine penton par immunotitration suivie d'une quantification par cytométrie de flux est décrite dans Boyle et al., « Determination of adenoviral vector activity using an immunotitration method », poster présenté au « 5<sup>th</sup> annual meeting of viral vector and vaccines, (1998) ».

20

### **Exemple 2**

#### **Conservation à +4°C de compositions selon l'invention ; stabilité physique des particules virales :**

25 Le tableau ci-après montre les résultats obtenus en fonction de la nature de la solution tampon et la stabilité physique des particules virales déterminée par l'analyse chromatographique des préparations :

Formulation	Concentration initiale ( $\times 10^{12}$ pv/ml)	Concentration virale au temps considéré (en jours) ( $\times 10^{12}$ pv/ml)					
		10	15	20	35	60	90
*Tris/HCl + glycérol 10%	8,9	9,8			9,7	10,1	10,2
*Tris/HCl + glycérol 10% + pluronic F68 10%	8,3	9,0			8,4	9,0	8,9
*Tris/HCl + glycérol 10% + PEG 400 10%	6,6	7,2			7,2	6,9	
*Tris/HCl + glycérol 10% + PEG 8000 10%	7,5	8,0			8,2	8,6	8,0
*Tris/HCl + glycérol 10% + saccharose 5%	7,4		7,7		8,5	7,9	8,5
L-Lysine [20 mM, pH = 8,4] + glycérol 10%	8,7	10,3			9,2		
<b>Comparaison</b>							
*Tris/HCl + saccharose 5%	6,3		5,7	1,9	0,015		
*Tris/HCl + saccharose 10%	10,5	8,4		0,7			

\*Tris/HCl : 20 mM ; pH = 8,4 - % glycérol : vol/vol - % saccharose : vol/vol

### Exemple 3

5 **Conservation à +4°C de compositions selon l'invention ; effet de la concentration en glycérol :**

Le tableau ci-après montre les résultats obtenus en fonction de la concentration en glycérol dans la formulation et donne la stabilité physique des particules virales déterminée par l'analyse chromatographique des préparations :

Formulation	Concentration virale ( x 10 <sup>12</sup> pv/ml) au temps considéré						
	0	15 jours	1 mois	2 mois	3 mois	4,5 mois	6 mois
*Tris/HCl + glycérol 10% (vol/vol)	6,7	7,9	8,2	7,8	8,4	7,5	6,0
*Tris/HCl + glycérol 15 % (vol/vol)	5,8	6,7	6,8	6,9	6,8	6,3	5,8
*Tris/HCl + glycérol 20 % (vol/vol)	5,4	6,3	6,5	6,4	7,1	6,0	5,8
*Tris/HCl + glycérol 25 % (vol/vol)	5,7	6,5	6,6	6,6	7,1	6,5	6,2
<b>Comparaison</b>							
Tris/HCl 10 mM + MgCl <sub>2</sub> 1mM + glycérol 10% (vol/vol)	11,8	10,4	0,9	-	-	-	-
Tris/HCl 10 mM + MgCl <sub>2</sub> 1mM + NaCl 150 mM + glycérol 10% (vol/vol)	10,3	5,0	0,8	-	-	-	-
Tris/HCl 10 mM + MgCl <sub>2</sub> 1mM + saccharose 1M	6,9	7,7	7,6	5,9	0,58	0,47	0,15

\*Tris/HCl : 20 mM, pH = 8,4.

- 5 Les résultats présentés dans le tableau ci-dessus confirment clairement qu'une teneur de 10 % (vol/vol) est efficace pour la stabilisation physique des particules sur une période de 6 mois au moins. L'efficacité est également confirmée pour les formulations incluant plus de 10 % de glycérol. Aucune des formulations antérieurement connues n'apportait une stabilisation sur une durée aussi prolongée : notamment la formulation comprenant Tris/HCl 10 mM + MgCl<sub>2</sub> 1mM + saccharose 1M ne s'avère pas appropriée pour stabiliser les particules adénovirales à



concentration élevée ( $6,9 \times 10^{12}$  pv/ml), la concentration virale chute rapidement à partir du 2<sup>ème</sup> mois.

#### Exemple 4

#### **Pouvoir infectieux des adénovirus conservés selon l'invention à +4 ou +20°C :**

- 5 Le pouvoir infectieux des particules virales est mesuré par la capacité des particules à exprimer le transgène qu'elles comportent et à conduire à l'expression de la protéine correspondante. La protéine est ici la protéine penton (protéine III) qui est détectée par immunotitration en utilisant une méthode de marquage avec un anticorps (anti-penton) suivie d'une analyse en cytométrie de flux. Le résultat obtenu est exprimé en
- 10 unités d'infection par ml de solution (UI/ml). Le calcul du ratio pv/UI représente une seconde façon d'exprimer l'évolution du titre infectieux au cours du temps. Dans les conditions expérimentales utilisées, ce ratio a une valeur de  $20 \pm 10$  environ pour une préparation virale fraîchement obtenue avant mise en conservation.

- 15 Le tableau ci-après montre le pouvoir infectieux des particules formulées en glycérol ou en saccharose après 6 mois de conservation à +4°C ou après 1 mois de conservation à +4°C puis 3,5 mois de conservation à +20°C.

Formulation	Titre initial	Titre après 6 mois à +4°C			Titre après 1 mois à +4°C puis 3,5 mois à +20°C		
	pv/ml ( $\times 10^{12}$ )	pv/ml ( $\times 10^{12}$ )	UI/ml ( $\times 10^{11}$ )	pv/UI	pv/ml ( $\times 10^{12}$ )	UI/ml ( $\times 10^{11}$ )	pv/UI
*Tris/HCl + 10 % glycérol	6,7	6,0	3,0	20	4,2	1,1	38
*Tris/HCl + 15 % glycérol	5,8	5,8	4,1	14	5,3	1,4	38
*Tris/HCl + 20 % glycérol	5,4	5,8	4,6	13	5,4	1,4	39
*Tris/HCl + 25 % glycérol	5,7	6,2	5,0	12	6,1	1,8	34
<b>Comparaison</b>							
10 mM Tris/HCl + 1 mM MgCl <sub>2</sub> + 1 M saccharose	6,9	0,15	< 0,004	> 375	1,0	0,08	125
10 mM Tris/HCl + 1 mM MgCl <sub>2</sub> + 1 M saccharose	0,36	0,30	0,36	9	0,32	< 0,004	> 800

\*Tris/HCl : 20 mM, pH = 8,4.

Cette étude montre que l'activité virale est particulièrement bien préservée à +4°C pour toutes les concentrations en glycérol égales ou supérieures à 10 %. De même, les préparations conservées 1 mois à +4°C puis 3,5 mois à +20°C et contenant au moins 10 % de glycérol ont conservé leur capacité d'infection. La possibilité de  
5 conserver à long terme et à température ambiante, des préparations adénovirales très concentrées est démontrée pour la première fois. La formulation de comparaison contenant du saccharose et du chlorure de magnésium ne permet pas la conservation du virus concentré ( $6,9 \times 10^{12}$  pv/ml) ni à +4°C ni à +20°C. La formulation à faible  
10 concentration ( $0,36 \times 10^{12}$  pv/ml) voit son titre décroître après une conservation d'un mois à +4°C suivie d'une conservation de 3,5 mois à +20°C.

Après trois mois de conservation, les différentes préparations ont été analysées par microscopie électronique. Ces analyses montrent que :

A une concentration de 20 % en glycérol les particules apparaissent natives, pleines,  
15 entières, et symétriques. Pratiquement aucune sous-unité libre n'est détectable dans le milieu. En revanche, dans la formulation de comparaison à concentration virale élevée, les particules sont pour la plupart agrégées soit en massifs contenant environ 50 particules, soit en structures filamenteuses. Certaines particules ont perdu une partie de leurs capsomères et ont une structure plus arrondie ou ovoïde. Les  
20 capsomères et les fibres libérés dans le milieu restent totalement dispersés et sont très facilement observables. Ceci est observé aussi bien à +4°C qu'à +20°C.

### **Exemple 5**

**Pouvoir infectieux d'une préparation adénovirale formulée dans le Tris/HCl + glycérol et conservée à -20°C :**

25 Dans cet exemple, le pouvoir infectieux des particules est déterminée par la titration en pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond à la détermination du pouvoir infectieux d'une solution d'adénovirus. Cette détermination est effectuée par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 15 jours d'incubation, du nombre de plages de cellules infectées. Ces dosages reposent sur des  
30 méthodes biologiques et les valeurs obtenues sont dans une certaine mesure fonction des conditions opératoires utilisées [J. Virol., 70, 7498 (1996)].

Le tableau ci-après montre le titre infectieux, mesuré dans un test pfu, d'une préparation virale conservé 2 mois à -20°C.

Formulation	Titre initial	Titre à J60	Titre à J60	Ratio pv/pfu à J 60
	pv/ml (x 10 <sup>12</sup> )	pv/ml (x 10 <sup>12</sup> )	pfu/ml (x 10 <sup>11</sup> )	
20 mM Tris/HCl (pH 8,4) + 10 % glycérol	7,7	7,7	3,0	26

La valeur de la mesure du titre infectieux, et plus particulièrement le ratio pv/pfu indiquent que les particules virales n'ont pas été altérées par l'étape de congélation-décongélation, ni par la conservation durant 2 mois à -20°C. (Ce ratio a une valeur de 20 à 30 environ pour la préparation virale initiale).

#### Exemple 6

**Conservation à +4°C de compositions selon l'invention ; stabilité physique des particules virales :**

10 Le tableau ci-après montre les résultats obtenus en fonction de la nature de la solution tampon et la stabilité physique des particules virales déterminée par l'analyse chromatographique des préparations :

Formulation	Concentration initiale (x10 <sup>12</sup> pv/ml)	Concentration virale au temps considéré (en jours) (x10 <sup>12</sup> pv/ml)		
		30	60	90
20 mM Tris/HCl (pH 8,4) + glycérol 20 %	29,2	31,4	32,1	33,7
100 mM Tris/HCl (pH 8,4) + glycérol 20 %	7,7	8,4	6,0	8,3
20 mM Tris/HCl (pH 8,4) + glycérol 20 % + éthanol 10 %	13,9	14,8	14,7	15,0
20 mM Lysine/HCl (pH 8,4) + glycérol 20 %	7,8	8,4	6,8	7,7
20 mM Hepes/Na (pH 8,4) + glycérol 20 %	7,9	8,4	7,0	8,6

# REVENDICATIONS

- 1 - Composition liquide ou congelée contenant les particules adénovirales caractérisée en ce qu'elle comprend une solution tampon capable de fixer le pH du milieu à des valeurs légèrement alcalines, additionnée de glycérol et sans adjonction de cations métalliques divalents ou de cations alcalins.  
5
- 2 - Composition liquide ou congelée, selon la revendication 1, caractérisée en ce que la solution tampon est une solution capable de fixer le pH du milieu entre 8,0 et 9,6.
- 3 - Composition liquide ou congelée, selon la revendication 2, caractérisée en ce que la solution tampon est une solution capable de fixer le pH du milieu entre 8,4 et 8,8.  
10
- 4 - Composition liquide ou congelée, selon la revendication 3, caractérisée en ce que la solution tampon est une solution capable de fixer le pH du milieu à 8,4.
- 5 - Composition liquide ou congelée, selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la solution tampon est constituée d'un système acide/base comprenant le Tris ou la lysine et un acide choisi parmi un acide fort ou un acide faible, ou bien d'un système acide/base comprenant l'Hepes et une base forte.  
15
- 6 - Composition liquide ou congelée, selon la revendication 5, caractérisée en ce que que la solution tampon est constituée d'un système acide/base choisi parmi les systèmes Tris/HCl, lysine/HCl, Tris/acide maléique, Tris/acide malique, Tris/acide acétique et Hepes/soude.  
20
- 7 - Composition liquide ou congelée, selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle contient en outre un adjuvant choisi parmi des polymères, des sucres, ou un alcool.
- 8 - Composition liquide ou congelée, selon la revendication 7, caractérisée en ce que les polymères sont choisis parmi les polyéthylène glycols, les pluronics ou les polysorbates, les sucres sont choisis parmi le saccharose, le dextrose ou le mannitol et l'alcool est l'éthanol.  
25
- 9 - Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 8 pour la conservation d'adénovirus.  
30

- 10- Utilisation thérapeutique ou prophylactique d'une composition de particules adénovirales selon l'une des revendications 1 à 8, pour la préparation d'un médicament destiné à un traitement par thérapie génique.

ORIGINAL

REVENDECATIONS

- 1- Composition liquide ou congelée contenant les particules adénovirales caractérisée en ce qu'elle comprend une solution tampon capable de fixer le pH du milieu entre 8,0 et 9,6, additionnée de glycérol et sans adjonction de cations métalliques divalents ou de cations alcalins.  
5
- 2- Composition liquide ou congelée, selon la revendication 1, caractérisée en ce que la solution tampon est une solution capable de fixer le pH du milieu entre 8,4 et 8,8.
- 3- Composition liquide ou congelée, selon la revendication 2, caractérisée en ce que la solution tampon est une solution capable de fixer le pH du milieu à 8,4.  
10
- 4- Composition liquide ou congelée, selon la revendication 1, caractérisée en ce que la solution tampon est constituée d'un système acide/base comprenant le Tris ou la lysine et un acide choisi parmi un acide fort ou un acide faible, ou bien d'un système acide/base comprenant l'Hepes et une base forte.
- 5- Composition liquide ou congelée, selon la revendication 4, caractérisée en ce que que la solution tampon est constituée d'un système acide/base choisi parmi les systèmes Tris/HCl, lysine/HCl, Tris/acide maléique, Tris/acide malique, Tris/acide acétique et Hepes/soude.  
15
- 6- Composition liquide ou congelée, selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle contient en outre un adjuvant choisi parmi des polymères, des sucres, ou un alcool.  
20
- 7- Composition liquide ou congelée, selon la revendication 6, caractérisée en ce que les polymères sont choisis parmi les polyéthylène glycols, les pluronics ou les polysorbates, les sucres sont choisis parmi le saccharose, le dextrose ou le mannitol et l'alcool est l'éthanol.  
25
- 8- Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 7 pour la conservation d'adénovirus.
- 9- Utilisation thérapeutique ou prophylactique d'une composition de particules adénovirales selon l'une des revendications 1 à 7, pour la préparation d'un médicament destiné à un traitement par thérapie génique.  
30